

ヒト脂肪酸活性化酸素3および4の分子解析

著者	嶺倉 裕之
号	659
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/16354

氏 名(本籍) ^{みね} 嶺 ^{くら} 倉 ^{ひろ} 裕 ^{ゆき} 之

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 6 5 9 号

学位授与年月日 平 成 15 年 2 月 13 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ヒト脂肪酸活性化酵素 3 および 4 の分子解析

論文審査委員 (主 査) 教 授 駒 井 三 千 夫
教 授 秋 葉 征 夫
教 授 藤 本 健 四 郎

論文内容要旨

序 章

脂肪酸活性化酵素 (Acyl-CoA synthetase; EC 6.2.1.3、以下 ACS と略) は、ATP 存在下で、脂肪酸、CoA からアシル CoA の生成を触媒する。ACS により生成するアシル CoA は、ミトコンドリア、ペルオキシソームでは主として β -酸化系により分解され、エネルギー産生に利用され、小胞体ではトリグリセリド、リン脂質、コレステロールエステルなどの脂質合成に利用される。またアシル CoA は脂質代謝以外に蛋白質のアシル化や細胞内輸送、プロテインキナーゼ C の活性化、脂肪酸生合成などの調節にも重要である (Fig. 1)。

ラット cDNA クローニングにより、哺乳類には発現組織、基質特異性の異なる五つの ACS アイソザイム (ACS1-5) のあることが明らかにされている。

ACS1 は、肝臓、心臓、脂肪組織で、ACS2、および 3 は、脳で高く発現している。ACS4 は、ステロイド産生組織で高く発現している。ACS5 は、小腸で最も高く発現しており、肝臓、肺でも発現が認められる (Table 1)。ACS1、および 2 は、広い基質特異性を示し、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸をよい基質とする。ACS3、および 4 は、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸を最もよい基質とする。

ACS アイソザイムはいずれも、光コメツキ・ルシフェラーゼと相同性のある二つのルシフェラーゼ相同領域、二つのルシフェラーゼ相同領域をつなげるリンカー、N-末端領域、および C-末端領域の五つの領域から構成されている (Fig. 2)。ACS2、および 3 は、脳で高く発現しているが、発生段階を通じた発現パターンが大きく異なる。ACS4 ヘテロ欠損マウスでは、妊娠率、および産仔数の低下が報告されている。

本研究で述べる ACS3、および ACS4 は、基質特異性は類似しているが、発現組織が大きく異なる。ACS は脂肪酸の細胞内への取り込みにも重要な役割を果たしていることが報告されていることから、ACS3、および ACS4 は、必須脂肪酸であるアラキドン酸やエイコサペンタエン酸の取り込みと代謝に重要な役割を担っていると考えられる。

ある遺伝子の生理的意義や病態的意義を解明するアプローチはいくつか試みられており、その一つにトランスジェニックマウスや遺伝子欠損マウスの作製・解析がある。有用な手法ではあるが、問題点もある。

もう一つの試みとして、家系調査などにより遺伝的にマップされている疾患との相関を調べ、問題とする遺伝子の病態的意義を推定するという方法がある。この場合には、近傍にマップされている疾患との位置関係を明らかにするため、問題とする遺伝子の染色体上の詳細な位置情報が必要である。

近年ヒト・ゲノムの解読が進み、SNP などの遺伝子多型と疾患などとの相関を調べるという試みがなされている。この場合は蛋白質をコードする構造遺伝子部分のみならず、発現調節に関わる転写調節領域や、mRNA へのスプライシングに関わるエクソン-イントロン結合部も解析対象となるため、これらの遺伝子構造情報が必要である。

ACS3、および 4 遺伝子の構造解析を通して、これら遺伝子の発現調節機構、これらの遺伝子の異常とヒト疾患との関連を解明していくことを目的として、ヒト ACS3、および 4 の cDNA、および遺伝子構造の解析を行った。

第一章：ヒト脂肪酸活性化酵素 3 (hACS3) cDNA の単離および解析

ヒト ACS3 cDNA は、720 アミノ酸残基の蛋白質をコードしていた (Fig. 3A)。

Kozak により報告されている翻訳開始コドン周辺のコンセンサス配列と、ラット、およびヒト ACS3 cDNA の一番目、および二番目の Met (Met¹、および Met¹²) コドン周辺の塩基配列とを比較すると、いずれも二番目の Met (Met¹²) 周辺の配列のほうがコンセンサスに近い (Table 2)。ラット ACS3 では Alternative translation initiation により二つのアイソフォームが生成することが報告されており、ヒト ACS3 でも同様のことが推定される。

ACS3 蛋白質は、ヒト-ラット間で高度に保存されており、92.1%の相同性を示した (Fig. 3B)。

human/rodent hybrid cells の解析、fluorescent *in situ* hybridization

(FISH)により、ヒト ACS3 遺伝子は 2q34-35 にマップされた (Fig. 4)。

第二章：ヒト脂肪酸活性化酵素 3 (hACS3) 遺伝子の構造、詳細なマッピング、および転写調節領域の解析

ヒト ACS3 遺伝子は全長 80.6 kb、17 エクソンより構成され、5'-UTR に三つの大きなイントロンが挿入されていた (Fig. 5 and Table 3)。

STS marker 解析などにより、ヒト ACS3 遺伝子は、D2S360 と WI-21901 との間にマップされた (Fig. 6)。

5'-上流領域には、塩基配列上は多くの転写因子の結合可能な部位が存在した (Fig. 7)。

ヒト ACS3 mRNA は広範な組織で発現が見られ、特に前立腺、心臓、骨格筋、精巣で高く発現していた。癌細胞株では、ヒトメラノーマ由来の G361 細胞で高く発現していた (Fig. 8)。

ヒト ACS3 遺伝子最小プロモーターは、転写開始点より上流 321 bp 以内に存在する事が明らかになった (Fig. 9)。この領域には AP-2、NF-Y、p300 の認識配列が存在していた (cutoff score>85%; Fig. 7)。

第三章：ヒト脂肪酸活性化酵素 4 (hACS4) cDNA の単離および解析

ヒト ACS4 cDNA は、670 アミノ酸残基の蛋白質をコードしていた (Fig. 10A)。ACS4 蛋白質は、ヒト-ラット間で高度に保存されており、97.3%の相同性を示した (Fig. 10B)。

human/rodent hybrid cells の解析、FISH により、ヒト ACS4 遺伝子は Xq22-23 にマップされた (Fig. 11)。

第四章：ヒト脂肪酸活性化酵素 4 (hACS4) 遺伝子の構造、詳細なマッピング、および転写調節領域の解析

ヒト ACS4 遺伝子は全長 90 kb、16 エクソンより構成され、5'-UTR に二つの

大きなイントロンが挿入されていた (Fig. 12 and Table 4)。

STS marker 解析などにより、ヒト ACS4 遺伝子は、WI-17685 と CHLC. GATA81B07 との間にマップされた (Fig. 13)。

5'-上流領域には、塩基配列上は CREB など、多くの転写因子の結合可能な部位が存在した (Fig. 14)。マウス Y1 細胞では、db-cAMP や forskolin により ACS4 mRNA のレベルが上昇することが報告されており、この誘導に CREB が関与していることが推定される。

ヒト ACS4 mRNA は広範な組織で発現が見られ、特に胎盤、精巣、卵巣で高く発現していた。癌細胞株では、ヒト子宮頸癌由来の HeLa S3 細胞で高く発現していた (Fig. 15)。

ヒト ACS4 遺伝子最小プロモーターは、転写開始点より上流 166bp 以内に存在する事が明らかになった (Fig. 16)。この領域には、Sp1、AP-2、GCF、および CREB の認識配列が存在していた (Fig. 14)。

第五章：ヒト脂肪酸活性化酵素 3、4 (hACS3 and 4)、およびその遺伝子の構造比較

ヒト ACS3、および 4 蛋白質は、67.3%の相同性を示した。相同性はほぼ全域にわたって認められ、特に C 末端領域で 85.3%と高かった (Fig. 17)。

ACS ファミリーは、蛋白質の一次構造、および基質脂肪酸の特異性に基づき、二つのサブファミリーに分類されてきた。一つには ACS1、2、および 5 が、もう一つには ACS3、および 4 が属する。サブファミリー内アイソザイム間でのアミノ酸相同性は 60%以上であるが、異なるサブファミリーに属するアイソザイム間では 30%以下である (Table 5)。蛋白質の一次構造に基づく系統樹 (NJ 法) から、二つのサブファミリーの存在が示唆される (Fig. 18)。

ACS3、および 4 遺伝子のイントロン挿入位置は全て保存されているが、ACS1、2、および 5 遺伝子のものとは全く異なっている。両サブファミリーの祖先遺伝子は早い時期に分岐し、その後各サブファミリーメンバーの遺伝子が分岐して

きたものと考えられる (Fig. 19)。

五つのヒト ACS アイソザイム遺伝子は、それぞれ異なる染色体上にマップされており、ACS3、および 4 遺伝子の近傍にはタイプ IV コラーゲン遺伝子群がマップされている (Table 6)。さらに ACS3、あるいは 4 遺伝子とコラーゲン遺伝子との間には、insulin receptor substrate や potassium voltage-gated channel などの共通する遺伝子が同定されている (Table 7)。ACS3、および 4 遺伝子は、近傍の遺伝子も含めた広い領域が重複し、進化してきたと推定される。

ヒト ACS アイソザイム遺伝子との関連が示唆されている疾患を Table 6 に示す。Alport 症候群における多様な症状に、ACS 遺伝子など近傍の遺伝子の異常も関与することが推測される。Alport 症候群、その他の疾患に ACS3、あるいは ACS4 遺伝子がどのように関与しているのかを解明していくことは、今後の研究課題の一つである。本研究で明らかにしたヒト ACS3、および 4 遺伝子構造の情報は、SNP 解析等の多型解析による関連疾患の探索に有用と考えられる。

文 献

Fujino, T., Kang, M-J., Minekura, H., Suzuki, H., and Yamamoto, T.T., 1997. Alternative translation initiation generates acyl-CoA synthetase 3 isoforms with heterogeneous amino termini. J. Biochem. (Tokyo) 122, 212-216.

Iijima, H., Fujino, T., Minekura, H., Suzuki, H., Kang, M-J., Yamamoto, T., 1996. Biochemical studies of two rat acyl-CoA synthetases, ACS1 and ACS2. Eur. J. Biochem. 242, 186-190.

Kang, M-J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., Iijima, H. and Yamamoto, T.T., 1997. A novel arachidonate-preferring

acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2880-2884.

Minekura, H., Fujino, T., Kang, M-J., Fujita, T., Endo, Y. and Yamamoto, T.T., 1997. Human acyl-coenzyme A synthetase 3 cDNA and localization of its gene (ACS3) to chromosome band 2q34-q35. Genomics 42, 180-181.

Minekura, H., Kang, M-J., Inagaki, Y., Cho, Y-Y., Suzuki, H., Fujino, T., and Yamamoto, T.T., 2001. Exon/intron organization and transcription units of the human acyl-CoA synthetase 4 gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286, 80-86.

Minekura, H., Kang, M-J., Inagaki, Y., Suzuki, H., Sato, H., Fujino, T., and Yamamoto, T.T., 2001. Genomic organization and transcription units of the human acyl-CoA synthetase 3 gene. Gene 278, 185-192.

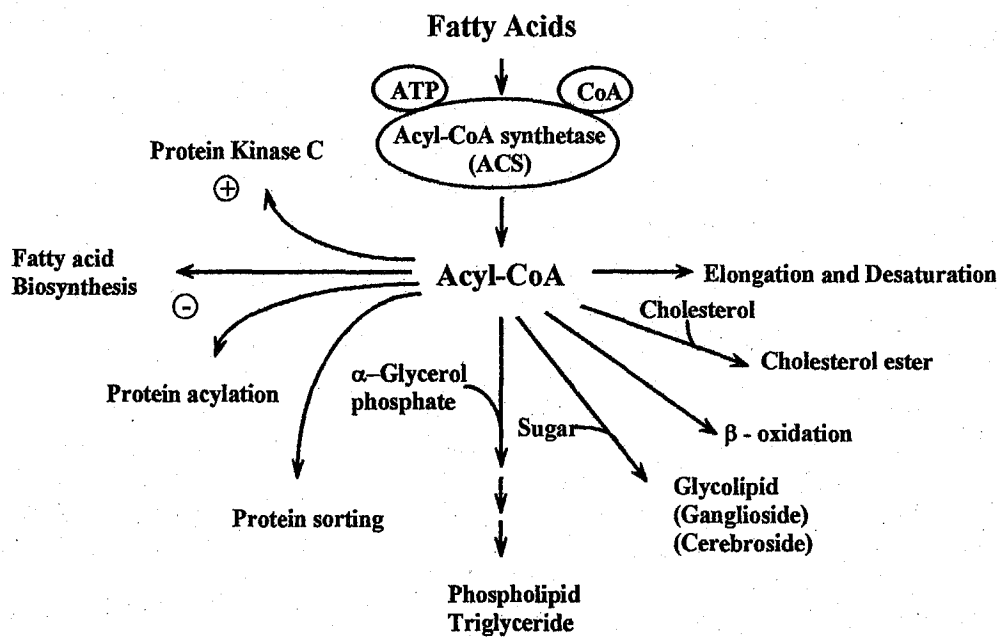


Fig. 1. Metabolic fate of Acyl-CoAs.

Table 1. Comparison of five rat ACS isozymes.

Isozymes	mRNA	fatty acids
ACS1	liver heart adipose tissue	palmitic acid lauric acid (broad)
ACS2	brain	palmitic acid (broad)
ACS5	small intestine lung liver	palmitic acid palmitoleic acid oleic acid linoleic acid linolenic acid
ACS3	brain	lauric acid myristic acid arachidonic acid eicosapentaenoic acid
ACS4	adrenal gland ovary testis	arachidonic acid eicosapentaenoic acid

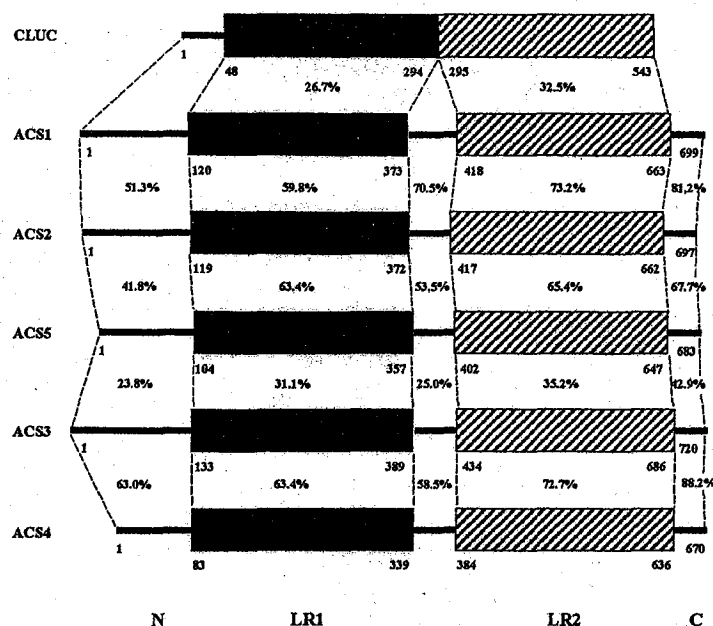


Fig. 2. Schematic comparison of amino acid sequences of five rat acyl-CoA synthetases and click beetle luciferase.

A

MNNHVSSKPSMTMLKHTINPILLYFIHFLISLYTILTYIPFYFFSESQRQESNRRIKAKPV 60
 NSKPDSAYRSVNSLDGLASVLYPGCDTLDKVFTYAKNFKNKRLLGTREVLNEEDEVPQN 120
 GKIFKKVILGQYNWLSYEDVFVRAFNFGNGLQMLGOKPKTNIAIECETRAEWMIAAQACE 180
 MYNFQLVTLYATLGGPAIVHALNETEVTNIITSKELLQTKLDIVSLVPRLRHIITVDGK 240
 PPTWSDPEPKGLIVHTMAAVEALGAKASMENOPHSKPLPSDIAVIMYTSGSTGLPKGVMIS 300
 HSNIIAGITGMAERIPELGEEDVYIGYLPPLAHVLELSAELVCLSHGCRIGYSSPOTLADO 360
 SSKIKKGSKGDTSMKPTLMAAVPEIMDRIYKNVMNKVSEMSSFQRLNFILAYNYKMEQI 420
 SKGRNTPLCDSFVFRKVRSLIGGNIRLLLCGGAPLSATTORFNNICFCCPVGOGYGLTES 480
 AGAGTISEVWDYNTGRVGAPLVCCEIKLKNWEEGGYFNTDKPHPRGEILIGGOSVTMGYY 540
 KNEAKTKADESEDENGORWLCTGDIGEFEPDGCLKIIDRKKDLVKLOAGEYVSLGKVEAA 600
 LKNLPLVDNICAYANSYHSYVIGFVVPNOKELTELARKKGLKGTWEELCNSCEMENEVLK 660
 VLSEAAISASLEKFEIPVKIRLSPEPWTPETGLVTDFAFKLRKELKTHYQADIERYGRK 720

B

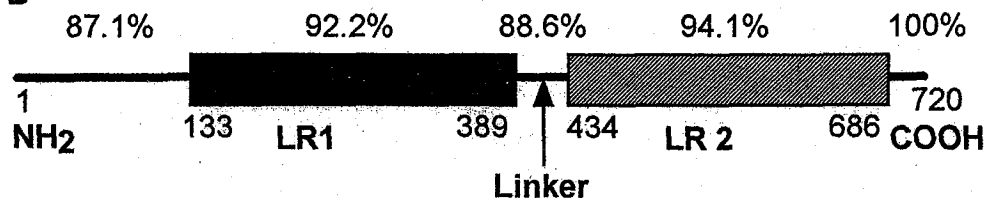


Fig. 3 A. Amino acid sequence of human ACS3 deduced from the human ACS3 cDNA. B. Schematic representation of ACS3.

Table 2. Comparison of the sequences surrounding the first and second methionine codons in rat and human ACS3 cDNAs with the consensus sequence proposed by Kozak.

Consensus		CC <u>ACC</u> ATGG
		<u>G</u>
Rat ACS3	Met ¹	agcaC <u>ATG</u> a
	Met ¹²	Ct <u>ACC</u> ATG <u>a</u>
Human ACS3	Met ¹	tactt <u>ATG</u> a
	Met ¹²	Ct <u>ACC</u> ATG <u>a</u>

Chromosome 2



Fig. 4. Chromosomal location of the human ACS3 gene.

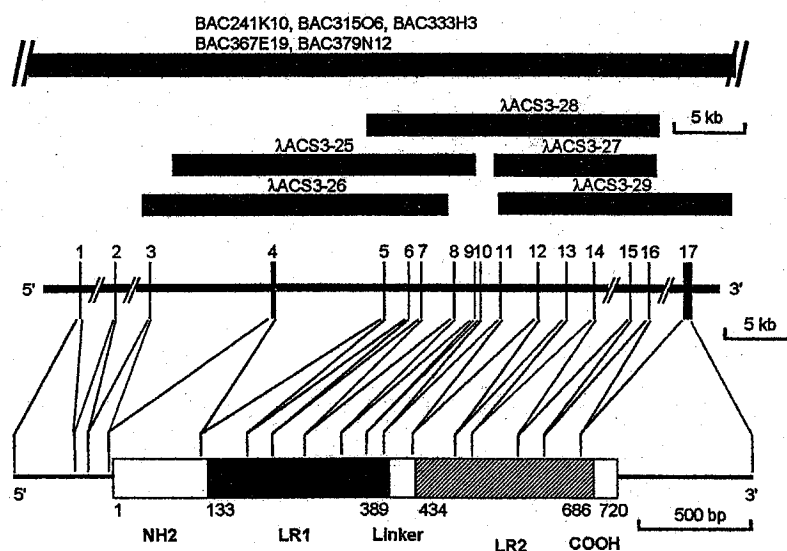


Fig. 5. Schematic diagram of overlapping λ and BAC clones encoding the human ACS3 gene.

Table 3. Exon/intron organization of the human ACS3 gene.

Exon No.	Exon size bp	Sequence at exon-intron junction				Amino acid interrupted	Intron length kb
		5' Splice donor		3' Splice acceptor			
1	213	GGC GTA GCG	gtgagtgcggcg	ttgttttgacag	GTT TTG ACA		26.6
2	59	TGT CAA CTG	gtaaaatattta	tattgtattoag	ATA CAG AAT		12.1
3	107	TCG AGG AAG	gtaaagaattac	tottcctcctag	ATT CTC GCT		8.0
4	418	TTT AAA AAG	gtaagatgatct	ttgtttttatcag	GTT ATT CTT	Lys126	7.2
5	178	TTT CAG C	gtatgtagactt	ttttccttttag	TT GTT ACA	Leu186	1.6
6	110	AAG TTG AAG	gtgaggactcta	gtgtatttttag	GAT ATA GTT	Lys222	0.9
7	139	AGC ATG G	gtatgtttacact	tottcaatgcag	AA AAC CAA	Glu269	2.1
8	151	GAA CTA GG	gtatgtcatagt	cttttcttttag	A GAG GAA	Gly319	1.3
9	124	GCA GAT CAG	gtaagttcagtg	cttattttgttag	TCT TCA AAA	Gln360	0.2
10	72	GCA GTT CCG	gtaagaagtgcac	ttatacatttag	GAA ATC ATG	Pro384	1.3
11	140	TGC GAC AG	gtaagtaaagac	ttttttcttttag	C TTT GTT	Ser431	2.4
12	173	TCC GAA G	gtagtgttctcc	tttaattcctag	TG TGG GAC	Val489	1.7
13	75	GAG GAA G	gtaataaactat	ttatttttattag	GT GGA TAC	Gly514	1.7
14	192	ATT ATT G	gtaagtcactcta	tttgttttgcag	AT CGT AAA	Asp578	2.4
15	115	GCA AAC AG	gtaagaacgtgy	tctatatttcag	T TAT CAT	Ser616	1.3
16	158	ATT TCA G	gtgagtatttcgy	taatcatcttag	CA AGT CTG	Ala669	6.8
17	740						

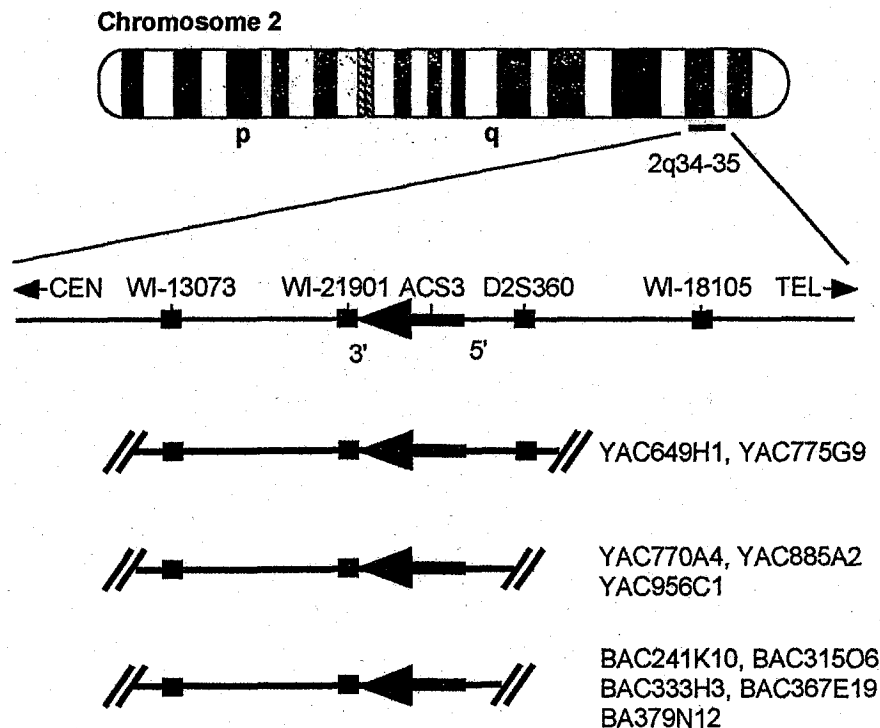


Fig. 6. Localization of the human ACS3 gene on the YAC contig map.

CAGCAAAACAAGATGAGAAATTTAGAAATTTAATCCAGGACCATTTTCTTTAAATATAGGTCCATATCCATAATATATATCCATAATATAAGATAATGAAGAAAGATATGTTGGAA -1382
 SRY
 TTCTTCTAGTCTGTTTATAGGCTTATGGATAGATATAAAAGGTGCAATATTAGTTTCTTCTCTCGGAAAAAACCAAGTATTTCCAGAGGATTTCATGGTTCTAGAGTACTACTTCTTAAA -1262
 GATA-1&2
 GCCTGCTTCTCTCTGAGAGCTGCGAATGTCTTTTCAGATAAGAAATCTGCATTCCTTTATCTTCAGAGTGTATCCTTTGATAAGATTTCACAGATTAAATGAGCAACTGAACTGCCA -1142
 GATA-1 CdxA CdxA CdxA c-Myb
 TATTTTGAAGTGGGAGAACAGTTTGCCTGAGTCAGGTATCCATCCCTTTAGGTTCTCGAATTGGCCCTGGGCCACGGTGAGTGAGCTCTCTTTGCTTGGTGCAATCGCTCCACCTAGT -1022
 Nkx-2.5 AP-1
 TCAAGTTCTGGCGCTTCTCTGATTTTCTCTCTTGGGAAATGAGGCTGCTTTAGCCTGAGGCTGCTCAGGAAGGCAACCTTTCACTTAAAGGAAAAGTTCACAGGCAAACTAAA -902
 SRY
 CAATATGTTGGGTTAAAAAAGAGACCAATCTCTAGTACTGGGTGAGTGAAAACTTCTCTCTTCTCTTACAGTACATGTAGTTCTACTACCTGCACTGGAGTCTTCTTCTTCTTCTTGT -782
 SRY CCAAT
 TAGTGTCTAAAAACGAGAAACCAATGGCAATCTCTTAAATACAGAACCACTGTGGATTCTTAAGAACGTTCAAAAAACAATAATTTGGAGTAAACITTTATTTTGAAGAAATAGCAAA -662
 SRY
 TTTGCAATGTTGAGTGCAATTTAGAGGAAAAACGGGTTATATGCTAGGTCAAGTGAGGCCAAAAAGAGAGAAATGATAATGGATAAGCTTTGAGTTTGTAGGCTCTTCTTGGCCCAAGGAGT -542
 NF-AT Nkx-2.5 SRY
 TCCAAAAAGCCATTTTATTTGGCAGGATTGACAGCAATTTCTGCAAGAACGGGATACTAATCCAGTTAAAAAAGGAAATATGCATATTTTATATTTGAAATTTTATA -422
 CdxA GATA-2 Oct-1 CdxA CdxA
 CATTACAGCAATAATTTGGGACTGTAATTTTTTTTTTTTTTTTGGTGGAGGGGTGTTTTTCTGGAGGGACGGAGCTCTGACAGCCCTATTGAGCTAGCGCTCTCTCCACGTC -302
 GCTGCCGAGATCCCGCTCCCTCCCGACCCGCGGTCCGTCCCTCTGCTGACCCCGTCCCGCCCGCCCGCCGCGCAGACTGCAGCCAGGTCCGGTCCGCGCGGCTCCGCGGAAT -182
 GACCCGTAGTAACCTCGCCCGCCCGCGGCGCCAGCGCGCGCTCCCGGCGGAATTCGATAGGCCAGCCCGCAGCGCCACCGCTCGCGGGCCAAATGGGTGGCAGCCTCTCTGCA -62
 (AP-2) (NF-Y)
 TAGGCAACGAGTGCCCGCCCGGCGGTGAGCTCCAGCGGTTCCGCTCAACAGACGCTGCTGTGGCTGCGCGGGCTGCGCACTGCAGTTGTCTACGCGCGCGGCGCGGACGAGGAG +59
 (p300) (c-Myb)
 GCGTTGGACGGGTCGATACGTTCTGCTCCCTCGCATTCGCGCCCGACAGCTGCGCCAGGATCCCGGGCGCGCGCGGGCGGTGAACGCTCTGGGCTCAGCCAGSCCTCGCGGGC
 CCGAGCGCGGAGAACCCCGACTCCGGGTGAGCGTgagtgoggc(Intron 1)ttgtttgacaggtTTTGACACAAGGGCGCATATCTTCAAAGCACTAGTACCTCTACCATTTG
 TCAACTGgtaaatattta(Intron 2)tattgtattcagATACAGAAATCGTTGTTGGGAAGGACTGGGAAAACAGCTGTAACATTTGCCACCCCTCAGAAAGCTGCTGGTCTGTGTCA
 CACCACCTTAGCCTCTTGATCGAGGAAGgtaagaattao(Intron 3)tcttctctagATTCCTGCTGAAGTCTGTTAATTCTACTTTTGTAGTACTTATGAATAACACGCTGTCT
 M N N H V S
 TCAAAACCATCTACCATGAAGCTAAAAATACCATCAACCT
 S K P S T M K L K R T I N P

Fig. 7. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the human ACS3 gene.

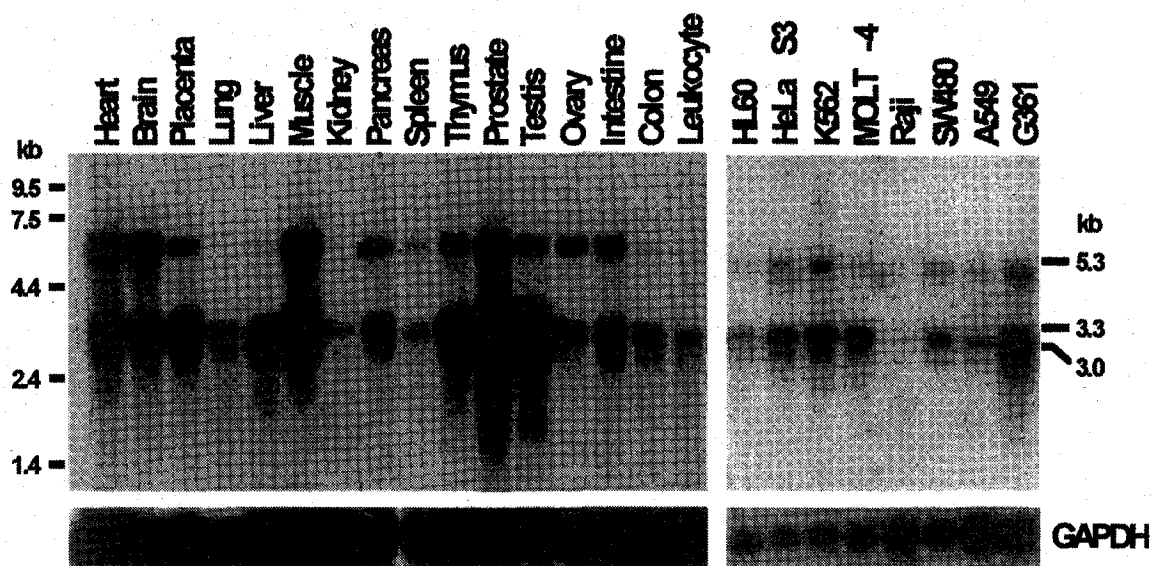


Fig. 8. Expression of ACS3 transcripts in human tissues and cancer cell lines.

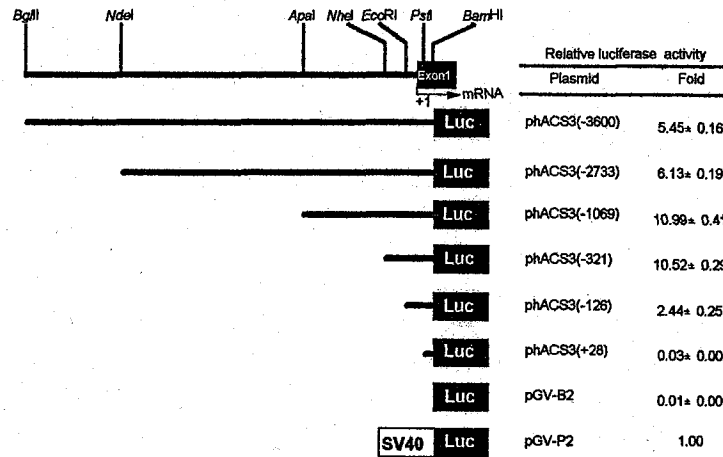


Fig. 9. Functional promoter activity of the 5'-flanking region of the human ACS3 gene fused to the firefly luciferase reporter gene.

A

MAKRIKAKPTSDKPGSPYRSVTHFDSLAVIDIPGADTLDKLFDHAVSKFGKKDSLGTREI 60
 LSEENEMQPNQKVFKKLILGNYKWMNYLEVNRRVNNFSGSLTALGLKPKNTIAIFCETRA 120
 EWMIAAOTCFKYNFPLVTLYATLQKEAVVHGLNESEASYLITSVELLESKLKTALLDISC 180
 VKHLIYVDNKAINKAEYPEGFEIHSMSOSVEELGSPENLGIPTSPRPTSPDMAIVMYTSGS 240
 TGRPKGVMMHHSNLIAGMTGOCERIPGLGPKDITYIGYPLAHVLELTAEISCFYGCRIQ 300
 YSSPLTLDOSKIKKSGKGDCTVLKPTLMAAVPEIMDRIYKNVMSKVQEMNYIQKTLFK 360
 IGYDYKLEQIKKGYDAPLCNLLLFKKVKALLGNVRMMLSGGGPLSPOTHRFNMVCFCCP 420
 IGOGYGLTESCGAGTVTEVTDYTTGRVGAPLICCEIKLKDWOEGGYTINDKPNRGEIVI 480
 GGONISMGYFRNEEKTAEDYSVDENGORWFCTGDIGEFHPDGLOIIDRKKDLVKLOAGE 540
 YVSLGKVEAALKNCPLIDNICAFKSDOSYVISEFVVPNQKRLTLAQQKGVEGTWVDICN 600
 NPAMEAEILKEIREAANAMKLERFEIPIKVRLSPEPWTPETGLVTDFAFKLKRKELRNHYL 660
 KDIERYMGKK 670

B

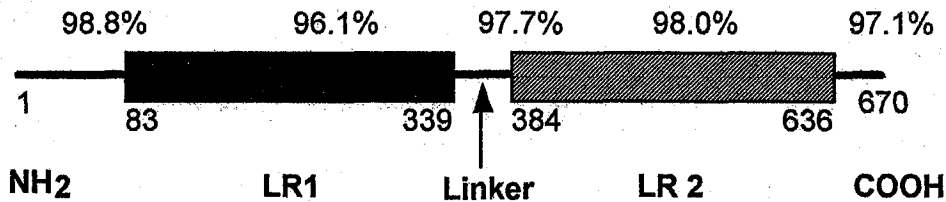


Fig. 10 A. Amino acid sequence of human ACS4 deduced from the human ACS4 cDNA. B. Schematic representation of ACS4.

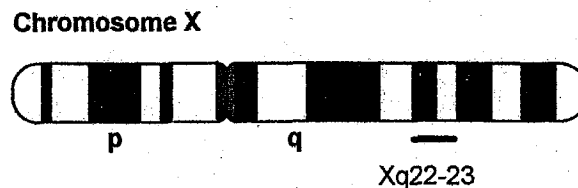


Fig. 11. Chromosomal location of the human ACS4 gene.

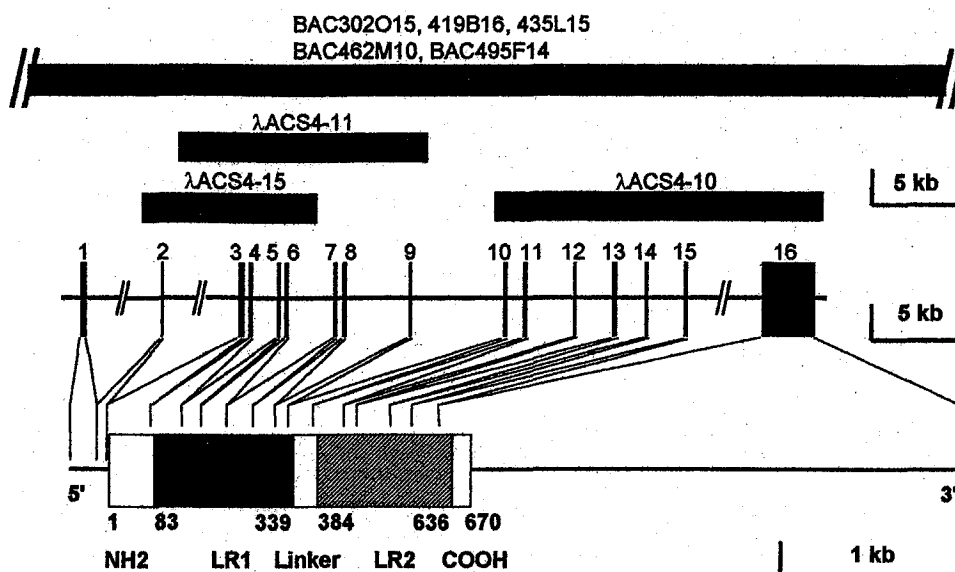


Fig. 12. Schematic diagram of overlapping λ and BAC clones encoding the human ACS4 gene.

Table 4. Exon/intron organization of the human ACS4 gene.

Exon No.	Exon size bp	Sequence at exon-intron junction			Amino acid interrupted	Intron length kb
		5' Splice donor	3' Splice acceptor			
1	145	GCC CCT CCG	gtgagtatccct ctcttactgcag	ATT GAA ATC		37.0
2	53	AGG ACA TTT F K K	gtaagtatttgt accaatgccaaag	AAG AAA AAC L I L		12.0
3	240	TTT AAG AAG F P L	gtaaagtatttt tcactttaacag	TTA ATT CIT V T	Lys76	0.2
4	178	TTT CCT C K L K	gtaagtgccttg tttattatgtag	TT GTG ACT T A L	Leu136	1.3
5	110	AAA CTT AAG E N L	gtaaatatgaag tctgctcaacag	ACT GCA TTG G I	Lys172	0.1
6	139	GAA AAC T G L G	gtaagtaagca tcattcatttag	TG GGC ATT P K	Leu219	2.6
7	151	GGA CTG GG S D Q	gtaagataattc attttgttttag	A CCG AAG S S K	Gly269	0.2
8	124	TCT GAC CAG A V P	gtgacaaacttt tctttaatatag	TCC AGC AAA E I M	Gln310	3.5
9	72	GCT GTT CCG C N L	gtgagtacagaa tttaactttcag	GAA ATC ATG L L	Pro334	5.2
10	140	TGC AAT CT T E V	gtaagtacattt ccctttattaag	G TTA CTG T D	Leu381	0.8
11	173	ACT GAA G Q E G	gtaagcattatt tttccctcacag	TA ACT GAC G Y	Val439	2.6
12	75	CAA GAA G I I D	gtaagaatttta tatgatttccag	GC GGT TAT R K	Gly464	2.0
13	192	ATT ATA G A K S	gtcagaatgttt atgacttaacag	AT CGT AAG D Q	Asp528	1.6
14	115	GCC AAA AG N A M	gtaactttccaa ctgttttttttag	T GAT CAG K L	Ser566	2.0
15	158	AAT GCC A	gtaagtaagaaa ttctaatttcag	TG AAA TTG	Met619	15.2
16	2854					

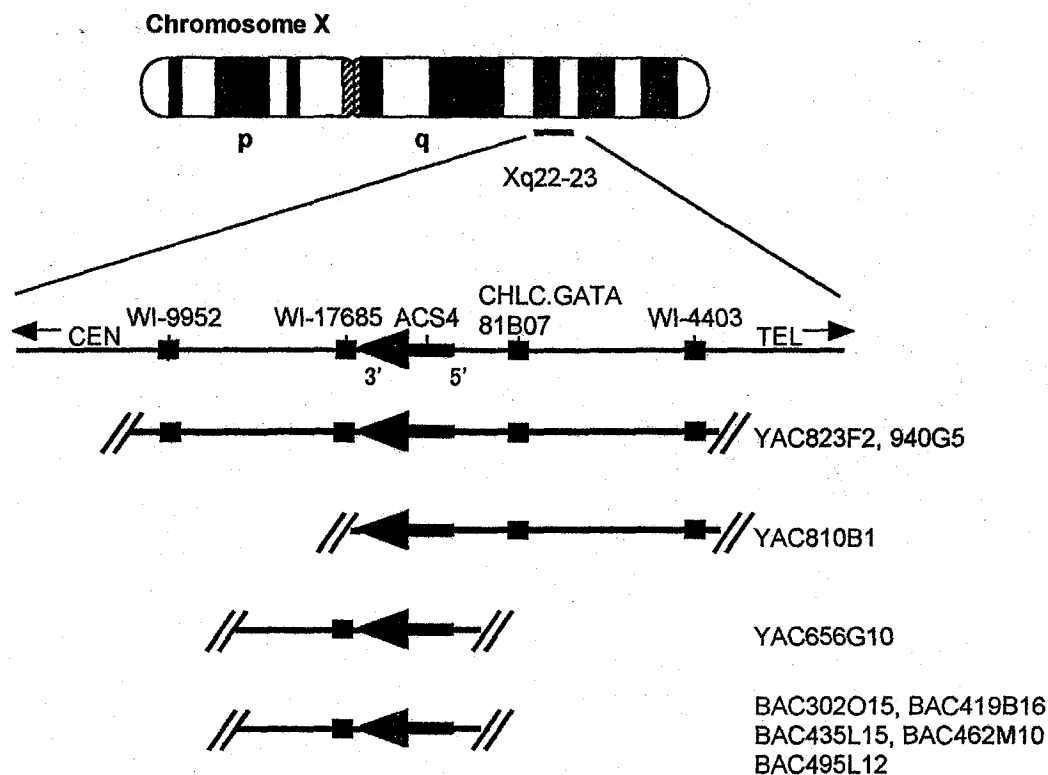


Fig. 13. Localization of the human ACS4 gene on the YAC contig map.

```

GAATCTTGGAGATTATTTTTGGGATATATCTTGGCAGTTTATCAGGCCTCATTTGCAATTATGCTGTCTGCTCTTTTGAAGCCCTCAGATAGTTCGCTGGCATTTTA -781
      CdxA      GATA-1      CdxA      GATA-2
ATTTTAATAGCAATTTCTTGCATCTGTTGGAAACAGCATTCTGTATGACCGGCTTATAAGCAATGATCAGGCTAOTAAAGATGTCACAAAGCTTGGGTGACTTTTCTTATCACTTGGGGT -661
      CdxA      MyoD      ANL-1a      c-Myb
TTTTTGGCATGATACCATCTGTGAAATGAAAGACAACGTGAAAATCTGCGTCTTGTGATATTTTCATCAGTGGGAGTGAAGCGGGATCTTAACGCAAGAGGCAAGATAAAGCGAT -541
      F300 MZF-1      GATA-1
GAGAGGCATTATTCAGGCTTACAGGAGCAAGATGCTTTAGTCAAAAGTGTTCAGATAGCTCTCTTAAAGAGGAGCAGTGAACCCAAAAATGAGTGTCTTTTGAAGGCACTGGAAGA -421
      PEA1      GATA-1 & 2 c-Myc      AP-4
TGACCCGAGGGGAATTTTATCTGCGGTGAGTCTGCGAAGCAAGCCGAGGTGAGGCGTGGGCTATTCTGCGCCTCACTGCTGTTAGGCGCAAGGACATCCGAAACACACTCAA -301
      MZF-1      UCAAT      SRY
CGACACCGAGCAGGAGCTGACAGAAGCGGATCCGAGCGGAGCAACACTTGAAGCGAGCCGTTAGCGGCTCTGCTCTCGCAAGCGCCCTCCGCGGCCCGGGAAGCCCGTTCCG -181
      AP-2      GCF AP-2 GCF
CTCCGCCCTTTTGGACTGACGCTCGGGCGAGCGGGCGGCGCGGTGGGTGGGCGGAGCCGCTGCGAGCCAGCGATTGCGCTGCTCTGCCACACCGCGCGGCCCGTCCGCGCCC -61
      CREB      Sp1      GCF GCF      Sp1 AP-2
GCTCCGGCGCGCTCTTTTCCGGGCTCGGCTGAAGTCCGCGCTCCGCGCTGCTGCGGCTGCGCGCTGCGCTTTTCTCTGCGCTCGCGCGCGCTGCTCTCTCCGAGC +60
      Sp1
GCTAGCGGGCAGCGGTTCTTTTGGGAGCTTCCGAGTGCCAGGCGCGGCGGCTGCGAAGACGCGGTGGGCGGCCCTCCGtgagatatecct(Intron 1: 37kb)ctettac +145
      M A K R
tgcsagATTGAAATCACAGAAGATATTCGTGTTCTTCTTAAGAGAAAAAGAGACATTTgtagtatttgr(Intron 2: 12kb)cccaatgccaagAAGAAAAACGCTATGCGAAAGA +220
      M A K R
GAATAAAGCTAAGCCGACTTCAGACAAACCTGGAAGTCATATGCTCTGTACACACTT +270
      I K A K P T S D K P G S P Y R S V T H F

```

Fig. 14. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the human ACS4 gene.

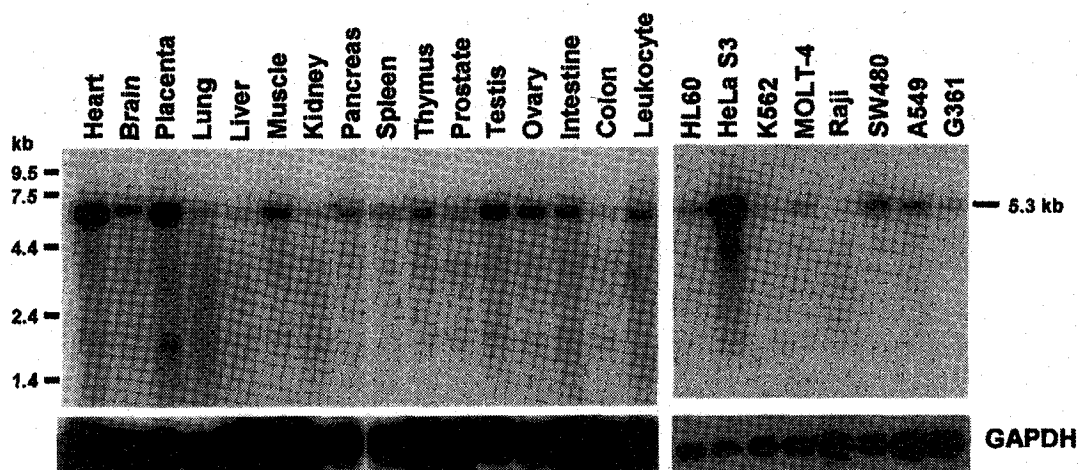


Fig. 15. Expression of ACS4 transcripts in human tissues and cancer cell lines.

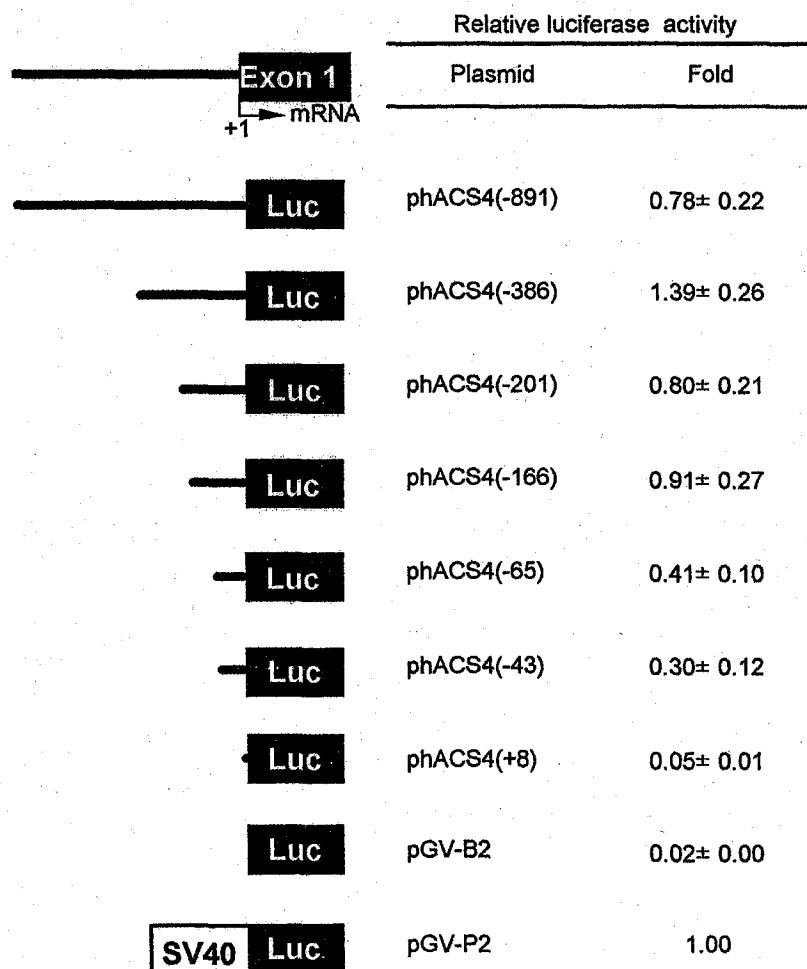


Fig. 16. Functional promoter activity of the 5'-flanking region of the human ACS4 gene fused to the firefly luciferase reporter gene.

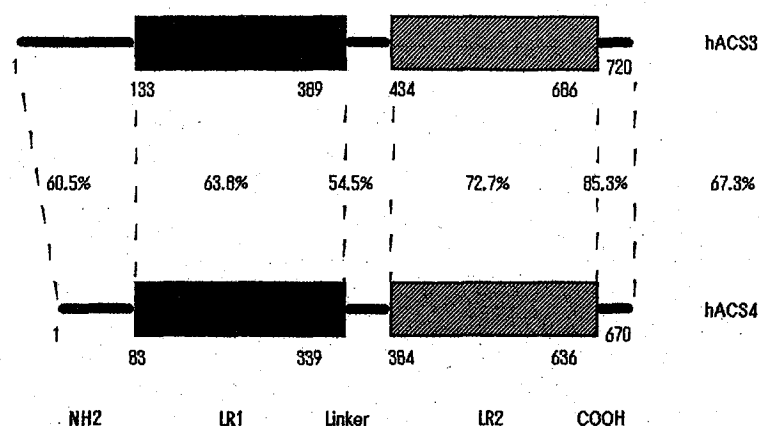


Fig. 17. Schematic representation of human ACS3 and ACS4. The percentage amino acid sequence identity between human ACS3 and ACS4 in each region is indicated.

Table 5. Comparison of sequence identity among five human ACS isozymes.

	Sequence identities (%)				
	hACS1	hACS2	hACS5	hACS3	hACS4
hACS1/698 aa		66.4	60.5	26.5	26.0
hACS2/697 aa			61.5	25.7	25.8
hACS5/683 aa				28.1	25.8
hACS3/720 aa					67.2
hACS4/670 aa					

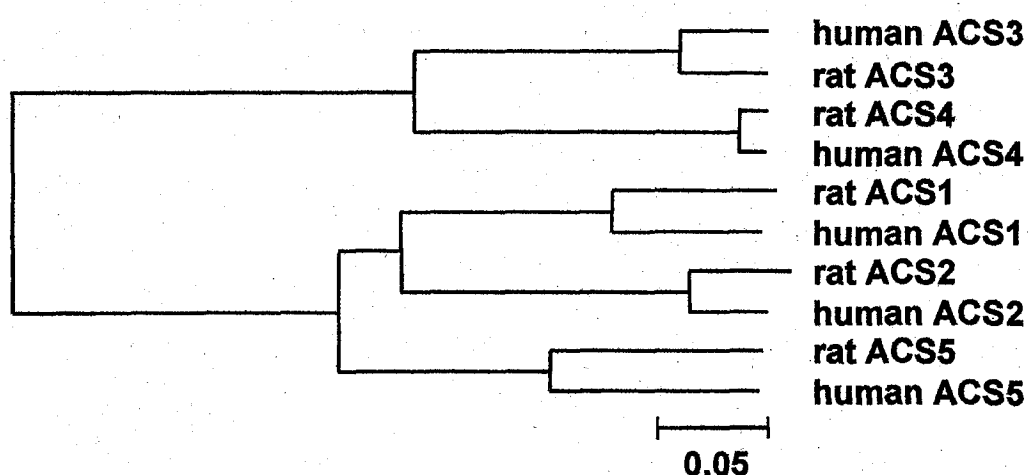


Fig. 18. Rooted phylogenetic tree of the members of human and rat ACS family. The tree was generated using the neighbor joining method.

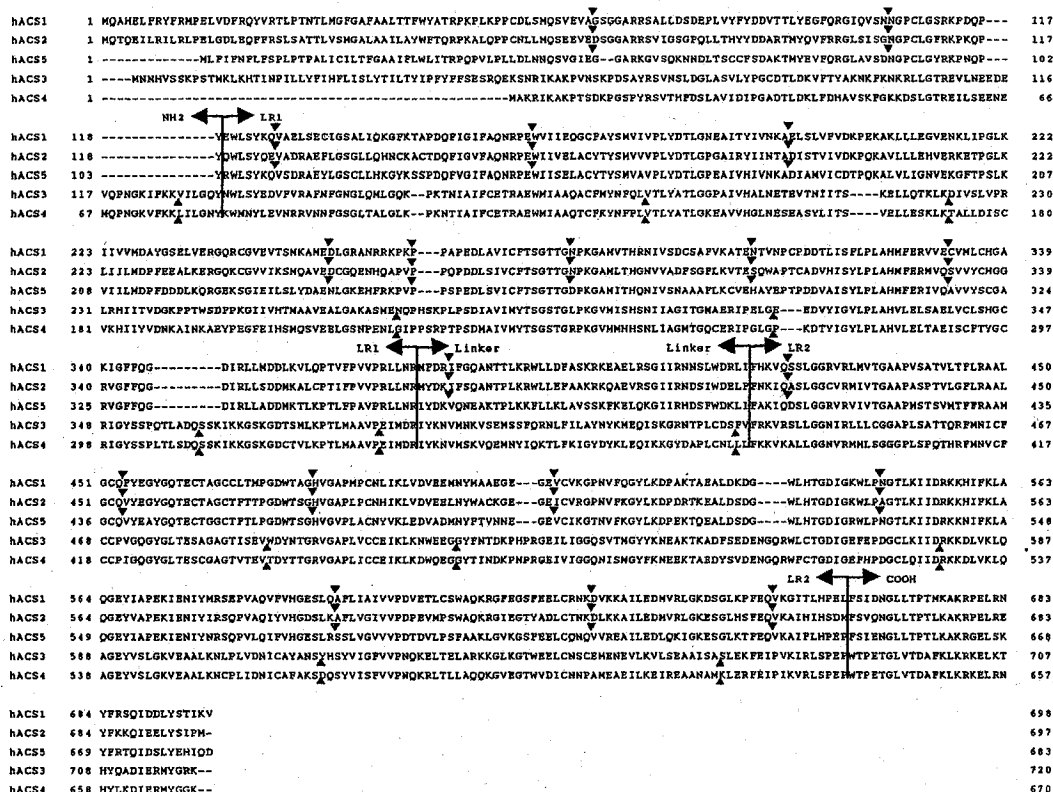


Fig. 19. Comparison of the exon/intron organization of the five human ACS genes. Arrowheads indicate the positions at which introns interrupt exons.

Table 6. Chromosomal locations of the five human ACS genes.

Genes	Loci	Neighboring genes	Related diseases
ACS1	4		?
ACS2	5q31-q32		Leukemia (Autosomal)
ACS3	2q34-q35	COL4A3 COL4A4	Alport's syndrome ?)
ACS4	Xq22-q23	COL4A5 COL4A6	X-linked Alport's syndrome
ACS5	10q25.1-		Glioma

Table 7. Genes identified on chromosome 2 and X around ACS and collagen genes.

Chromosome 2		Chromosome X	
DGAT2L1	diacylglycerol O-acyltransferase 2 like 1	FACL4	<u>fatty acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4</u>
FACL3	<u>fatty acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3</u>		
LOC151145			
LOC130347			
KCNE4	<u>potassium voltage-gated channel, Isk-related family member 4</u>	KCNE1L	<u>potassium voltage-gated channel, Isk-related family member 1-like</u>
LOC151141			
LOC151140			
SCG2	secretogranin II (chromogranin C)		
LOC255360		LOC222296	similar to mitofusin 1, isoform 1
AP1S3	sigma 1C adaptor		
FENS-1	phosphoinositide-binding protein SR1		
MRPL44	mitochondrial ribosomal protein L44	P15-2	
SERPINE2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor		
LOC130337	similar to Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 23		
LOC165249			
FLJ22746			
LOC151136			
CUL3			
LOC165248			
LOC200754		GUCY2F	guanylate cyclase 2F, retinal
FLJ20220			
KIAA0694			
LOC206406			
LOC254396		LOC255782	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
KIAA1486			
LOC164806			
LOC164807			
LOC205405			
LOC150965			
IRS1	<u>insulin receptor substrate 1</u>	IRS4	<u>insulin receptor substrate 4</u>
DKFZp547E05			
LOC205404			
COL4A4	<u>collagen, type IV, alpha 4</u>	COL4A5	<u>collagen, type IV, alpha 5</u>
COL4A3	<u>collagen, type IV, alpha 3</u>	COL4A6	<u>collagen, type IV, alpha 6</u>

論文審査結果要旨

脂肪酸活性化酵素 (Acyl-CoA synthetase, 以後 ACS と略) は, ATP 存在下で, 脂肪酸と CoA からアシル CoA の生成を触媒する。ACS により生成するアシル CoA は, β -酸化系によるエネルギー産生に利用される他, トリグリセリド, リン脂質, コレステロールエステルなどの脂質合成にも利用される。また蛋白質のアシル化や細胞内輸送, プロテインキナーゼ C の活性化, 脂肪酸合成などの調整にも重要である。ラット cDNA クローニングにより, 哺乳類には発現組織, 基質特異性の異なる五つの ACS アイソザイム (ACS1-5) のあることが明らかにされている。

本研究で対象とした ACS3, および ACS4 はアラキドン酸やエイコサペンタエン酸を最も良い基質とする点で類似しているが, 発現組織が大きく異なる。ACS は脂肪酸の細胞内への取り込みにも重要な役割を果たしていることが報告されていることから, ACS3, および ACS4 は, 必須脂肪酸であるアラキドン酸やエイコサペンタエン酸の取り込みと代謝に重要な役割を担っていると考えられる。本研究は, ACS3, および ACS4 遺伝子の発現調節機構, これらの遺伝子の異常とヒト疾患との関連を解明していくことを目指し, ヒト ACS3, および 4 の cDNA, および遺伝子構造の解析, マッピングを行ったものである。

ヒト ACS3 cDNA は, 720 アミノ酸残基の蛋白質をコードしており, ACS3 蛋白質は, ヒト-ラット間で 92.1% の相同性を示した。ヒト-げっ歯類雑種細胞の解析, fluorescent in situ hybridization (FISH) により, ヒト ACS3 遺伝子は 2q34-35 にマップされた。ゲノム DNA クローンの解析により, ヒト ACS3 遺伝子は全長 80.6kb, 17 エクソンにより構成され, 第二染色体上の STS マーカー, D2S360 と WI-21901 との間に存在することが示された。ヒト ACS3 遺伝子最小プロモーターは, 転写開始点より上流 321bp 以内に存在することが明らかにされた。

ヒト ACS4 cDNA は, 670 アミノ酸残基の蛋白質をコードしており, ACS4 蛋白質は, ヒト-ラット間で 97.3% の相同性を示した。ヒト-げっ歯類雑種細胞の解析, FISH により, ヒト ACS4 遺伝子は Xq22-23 にマップされた。ゲノム DNA クローンの解析により, ヒト ACS 4 遺伝子は全長 90kb, 16 エクソンにより構成され, X 染色体上の STS マーカー, WI-17685 と CHLC.GATA81B07 との間に存在することが示された。ヒト ACS4 遺伝子最小プロモーターは, 転写開始点より上流 166bp 以内に存在することが明らかにされた。

ACS ファミリーは, 蛋白質の一次構造, および基質脂肪酸の特異性に基づき, 二つのサブファミリーに分類されてきた。本研究により明らかにされた遺伝子の構造も, 二つのサブファミリーの存在を強く支持する。二つのサブファミリーの存在を, 遺伝子の構造から初めて示したものである。

ACS3, および ACS4 遺伝子の近傍には, 常染色体性, および X 連鎖 Alport 症候群の原因遺伝子とされるタイプ IV コラーゲン遺伝子群が存在することが明らかになった。さらに ACS 遺伝子とコラーゲン遺伝子との間には, insulin receptor substrate や potassium voltage-gated channel などの共通する遺伝子が同定されている。本研究では, ACS3 および 4 遺伝子は近傍の遺伝子も含めた広い領域が重複し, 進化してきたことを示唆する重要な知見をも提供した。Alport 症候群やその他の疾患に ACS3, あるいは ACS4 遺伝子がどのように関与しているのかを解明していくことは, 今後の研究課題の一つではあるが, 本研究で明らかにされたヒト ACS3, および 4 遺伝子構造の情報は, SNP 解析等の多型解析による関連疾患の探索にも有用と考えられる。

以上の本研究の論文内容から, 審査委員一同は, 本研究者が博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。